

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2005 年 4 月 28 日 (28.04.2005)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2005/037267 A1

- (51) 国際特許分類: A61K 31/203, 9/51, 47/02, 47/10, 47/30, A61P 3/02
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2003/013180
- (22) 国際出願日: 2003 年 10 月 15 日 (15.10.2003)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社 LTT バイオファーマ (LTT BIO-PHARMA CO.,LTD.) [JP/JP]; 〒105-6201 東京都 港区 愛宕 2 丁目 5 番 1 号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 山口 葉子 (YAMAGUCHI, Yoko) [JP/JP]; 〒258-0022 神奈川県 足柄上郡 開成町 牛島 2 7-1 7 Kanagawa (JP). 五十嵐 理

慧 (IGARASHI, Rie) [JP/JP]; 〒214-0036 神奈川県 川崎市 多摩区 南生田 5 丁目 8-2 Kanagawa (JP). 水島 裕 (MIZUSHIMA, Yutaka) [JP/JP]; 〒106-0032 東京都 港区 六本木 6 丁目 1 2-3-2 4 0 2 Tokyo (JP). 武永 美津子 (TAKENAGA, Mitsuko) [JP/JP]; 〒216-0015 神奈川県 川崎市 宮前区 菅生 2 丁目 3 0-1 Kanagawa (JP). 中村 なつみ (NAKAMURA, Natsumi) [JP/JP]; 〒216-0005 神奈川県 川崎市 宮前区 土橋 7 丁目 1-5-1 1 1 Kanagawa (JP).

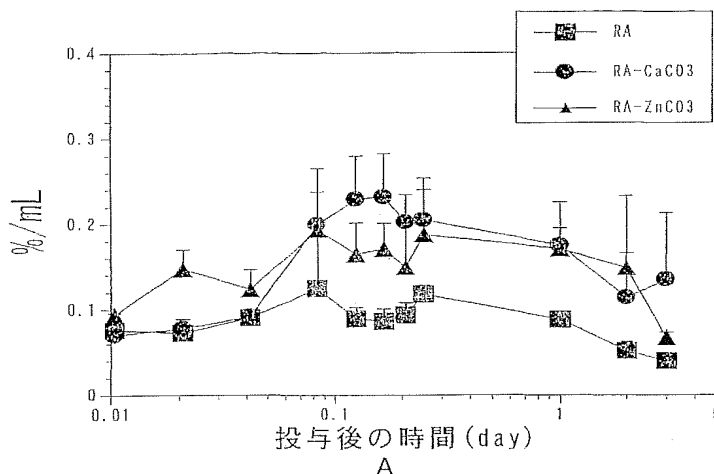
(74) 代理人: 草間 攻 (KUSAMA, Osamu); 〒102-0072 東京都 千代田区 飯田橋 4 丁目 5 番 1 2 号 岩田ビル 7 階 草間特許事務所 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR,

/ 続葉有 /

(54) Title: METHOD OF CONTROLLING PARTICLE SIZE OF RETINOIC ACID NANOPARTICLES COATED WITH POLYVALENT METAL INORGANIC SALT AND NANOPARTICLES OBTAINED BY THE CONTROLLING METHOD

(54) 発明の名称: 多価金属無機塩被覆レチノイン酸ナノ粒子の粒径の調整方法および当該調整方法により得られたナノ粒子



A...TIME (DAYS) AFTER ADMINISTRATION

(57) Abstract: It is intended to provide a method of controlling the particle size of retinoic acid nanoparticles having relieved irritation, which can be subcutaneously and intravenously administered, is usable as a sustained release preparation, and has such a high skin-permeability as allowing the use thereof as an external preparation such as a drug or a quasi drug as well as a cosmetic to be applied to the skin, etc., and nanoparticles obtained by the controlling method. More specifically speaking, the controlling method comprises dispersing a solution of retinoic acid in a lower alcohol together with an aqueous alkali solution, further adding a nonionic surfactant thereto to give a mixture micell, adding a metal chloride or acetate and an alkali metal carbonate or phosphate at a molar ratio of from 1:0 to 1.0 to thereby form a film of a polyvalent metal inorganic salt on the micell surface, and then regulating the particle size to 5 to 300 nm. As the polyvalent metal inorganic salt, use is made of calcium carbonate, zinc carbonate or calcium phosphate.

/ 続葉有 /



WO 2005/037267 A1



LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),

OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(57) 要約: 皮下投与および静脈内投与が可能であり、徐放性製剤としても使用でき、さらに皮膚透過性が高く、したがって皮膚に塗布等をする医薬品および医薬部外品としての外用剤および化粧品にも使用できる、刺激性が低減されたレチノイン酸のナノ粒子について、その粒子径の調整方法および当該調整方法により得られたナノ粒子を提供する。その調整方法は、具体的には、レチノイン酸の低級アルコール溶液をアルカリ水溶液と共に分散し、さらに非イオン性界面活性剤を添加することにより調製した混合ミセルに、金属塩化物または酢酸化物と、アルカリ金属炭酸化物またはリン酸化物をモル比で1:0~1.0の範囲内で添加することによりミセル表面に多価金属無機塩の皮膜を形成し、その粒径を5~300nmの範囲内とすることによって行われる。その多価金属無機塩としては、炭酸カルシウム、炭酸亜鉛またはリン酸カルシウムである。

明細書

多価金属無機塩被覆レチノイン酸ナノ粒子の粒径の調整方法
および当該調整方法により得られたナノ粒子

5

技術分野

本発明は、多価金属無機塩被覆レチノイン酸ナノ粒子の粒径の調整方法、特に多価金属無機塩として、炭酸カルシウム、炭酸亜鉛またはリン酸カルシウムの皮膜を被覆したレチノイン酸ナノ粒子の粒径の調整方法、および当該調整方法により得られたナノ粒子に関する。

10

背景技術

近年、脂溶性ビタミンA酸であるレチノイン酸のES細胞 (embryo stem cell : 胚幹細胞)を含む種々の未分化細胞における分化誘導作用が注目されてきており、また、レチノイン酸の急性前骨髄性白血病に対する治療薬としての臨床的利用がなされている。

15

しかしながら、レチノイン酸は分子内にカルボキシル基を有する化合物であることから刺激性があり、皮下投与した場合には炎症もしくは注射部位の腫瘍化が認められ、また、脂溶性のために注射剤としての製剤化は困難なものである。したがってレチノイン酸については、種々の徐放化製剤、あるいはターゲット療法としてのドラッグデリバリー・システム (DDS) を応用した製剤化が検討されている [例えば、C. S. Cho, K. Y. Cho, I. K. Park, S. H. Kim, T. Sugawara, M. Uchiyama & T. Araiike: "Receptor-mediated delivery of all trans-retinoic acid to hepatocyte using poly(L-lactic acid) nanoparticles coated with galactose-carrying polystyrene", *J. Control Release*, 2001 Nov. 9:77(1-2), 7-15]。

20

また、生分解性ポリマーを使用した注射製剤も提案されている [例えば、G. G. Giordano, M. F. D. Refojo & M. H. Arroyo: "Sustained delivery of retinoic acid from microspheres of biodegradable polymer in PVR", *Invest. Ophthalmol. Vis.*, 1993 Aug. 34(9): 274-2745]。

25

さらにレチノイン酸は、上皮細胞増殖作用のため、皮膚のシワとり、皮膚の活性化・老化防止剤等として化粧品への応用が提案されている（Japanese Patent Laid-open Publication No. Hei 09-503499）が、カルボン酸としての性質のため、刺激性が強く、炎症を起す等の問題点があり、現実の化粧品への使用は不可能である。

かかる現状を鑑み、本発明者等は先に、皮下および静脈内注射が可能であり、徐放性製剤として使用することができるとともに、また皮膚に塗布した場合にはレチノイン酸の有する効果を有効に発揮し得る、レチノイン酸含有のナノ粒子を提供している [例えば、特願 2 0 0 3 - 1 7 2 4 9 3 ; 薬剤学, Vol. 62 Mar. 2002, Supplement, 日本薬剤学会第 1 7 年会講演要旨集 ; Drug Delivery System (DDS), Vol. 18, No. 3 May. : 221 (2003) ; 29th Annual Meeting of the Controlled Release Society in Collaboration with the Korean Society for Biomaterials; Final Program July 20-25 (2002)]。

先に提案しているレチノイン酸含有のナノ粒子は、レチノイン酸を少量の極性溶媒に溶解して、アルカリを含む水で分散させ、次に非イオン性界面活性剤を添加することより得られた混合ミセルに、2 価の金属塩を添加し、さらに 2 価の陰イオンをもつ塩を添加することにより調製されたものである。

かかるレチノイン酸含有のナノ粒子は、粒子表面に金属化合物の皮膜を形成してなるものであり、例えば 2 価の金属塩として塩化カルシウムを使用し、2 価の陰イオンをもつ塩として炭酸ナトリウムを使用した場合には、ナノ粒子表面に炭酸カルシウムの皮膜が形成されることとなる。

この本発明者等が先に提供しているレチノイン酸含有のナノ粒子は、レチノイン酸の両親媒性を利用して調製したものである。すなわち、レチノイン酸を水溶液中に分散させることにより、一旦球状ミセルに形成させ、ミセル表面をマイナス荷電に覆われた状態とする。次いで、非イオン性界面活性剤を添加し、さらに塩化カルシウムを添加することにより、ミセル表面のマイナス荷電にカルシウムイオン (Ca^{2+}) を吸着させ、レチノイン酸のミセル同士の凝集・沈澱を防ぐことによりミセル表面がカルシウムイオンで覆われた球状、もしくは卵形等を有するミセルとする。さらに炭酸ナトリウムを添加して、炭酸イオン (CO_3^{2-}) を

ミセル表面のカルシウムイオンに吸着（結合）させて、ミセル表面荷電を完全に中和させる。その結果、レチノイン酸のミセル表面に炭酸カルシウム皮膜が形成され、炭酸カルシウム被覆レチノイン酸ナノ粒子が調製される。

ところで一般に、沈澱法もしくは均一沈澱法で形成される炭酸カルシウム結晶は、通常カルサイトと呼ばれる水に対しての溶解性が殆どない結晶である。しかしながら、上記の方法でミセル表面に形成される炭酸カルシウムは、球状、もしくは卵形等を有する曲率をもつミセル表面に形成されていることより、硬い結晶構造をとりにくい。したがって、形成された炭酸カルシウム層は、いわゆるガラス構造を有するアモルファスもしくは準安定相であるバテライト構造を有している。炭酸カルシウム皮膜がアモルファスである場合は、硬い結晶構造でないことから、水への溶解性が高く、生分解性が向上し、容易に分解される。またバテライトを形成した場合は、一般に、炭酸カルシウムの他の結晶構造であるカルサイトあるいはアラゴナイトに比較して水への溶解度が高いため、容易に生分解される。

その結果、上記で得られた炭酸カルシウム被覆レチノイン酸ナノ粒子を生体内に投与等した場合には、ミセル表面の炭酸カルシウム皮膜層が容易に分解し、含有されているレチノイン酸が放出され、その結果、薬効を徐放的に発揮するものである。

レチノイン酸のミセル表面を金属化合物で被覆する場合には、上記した炭酸カルシウムのみならず、生体適合性を有する、例えば炭酸亜鉛、リン酸カルシウム等の多価金属無機塩であっても、同様の効果を発揮するものである。

しかしながら、上記のようにして形成された炭酸カルシウムをはじめとする多価金属無機塩被覆レチノイン酸ナノ粒子は、5～1000 nm程度の粒子径（直径）を有するものであって、所望の粒子径を有するナノ粒子を効率よく調製することができていない。特に、レチノイン酸を皮下あるいは静脈内投与する場合、または皮膚投与（塗布投与等）し、経皮吸収させる場合にはその粒子径は5～300 nm程度の極めて微細なナノ粒子であることが好ましい。

したがって本発明は、炭酸カルシウムをはじめとする多価金属無機塩被覆レチノイン酸ナノ粒子について、その粒径を5～300 nm程度の極めて微細なナノ

粒子とする、粒径の調整方法を提供することを課題とする。

かかる課題を解決するために、本発明者等は鋭意検討した結果、レチノイン酸のミセル表面に多価金属無機塩の皮膜を形成させる段階で、当該ミセルに添加させる金属ハロゲン化物または酢酸化物と、アルカリ金属炭酸化物またはリン酸化物とのモル比を適宜調整することにより、平均粒子径が5～300nm程度の粒径を有する多価金属無機塩被覆レチノイン酸ナノ粒子を調製し得ることを新規に見出し、本発明を完成させるに至った。

発明の開示

したがって本発明は、基本的態様として、

(1) レチノイン酸のミセル表面を多価金属無機塩の皮膜で被覆してなるレチノイン酸ナノ粒子の粒径の調整方法であって、

レチノイン酸の低級アルコール溶液をアルカリ水溶液と共に分散し、さらに非イオン性界面活性剤を添加することにより調製した混合ミセルに、2価金属ハロゲン化物または酢酸化物、およびアルカリ金属炭酸化物またはリン酸化物を、モル比で1:0～1.0の範囲内で添加することによりミセル表面に多価金属無機塩の皮膜を形成し、その平均粒子径を5～300nmの範囲内とすることを特徴とする多価金属無機塩被覆レチノイン酸ナノ粒子の粒径の調整方法；

(2) ミセル表面に被覆される多価金属無機塩の皮膜が、炭酸カルシウム、炭酸亜鉛またはリン酸カルシウムである上記(1)に記載する多価金属無機塩被覆レチノイン酸ナノ粒子の粒径の調整方法；

(3) 2価金属ハロゲン化物または酢酸化物が、カルシウムハロゲン化物、亜鉛ハロゲン化物、酢酸カルシウムまたは酢酸亜鉛である上記(1)に記載する多価金属無機塩被覆レチノイン酸ナノ粒子の粒径の調整方法；

(4) カルシウムハロゲン化物または亜鉛ハロゲン化物が、塩化カルシウム、臭化カルシウム、フッ化カルシウム、ヨウ化カルシウム、塩化亜鉛、臭化亜鉛、フッ化亜鉛およびヨウ化亜鉛からなる群から選択されるものである上記(3)に記載する多価金属無機塩被覆レチノイン酸ナノ粒子の粒径の調整方法；

(5) アルカリ金属炭酸化物またはリン酸化物が、炭酸ナトリウム、炭酸カリウム、リン酸ナトリウムおよびリン酸カリウムからなる群から選択されるものである上記(1)に記載する多価金属無機塩被覆レチノイン酸ナノ粒子の粒径の調整方法;

5 (6) 低級アルコールがメタノールまたはエタノールである上記(1)に記載する多価金属無機塩被覆レチノイン酸ナノ粒子の粒径の調整方法;

(7) 非イオン性界面活性剤が、ポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノオレート、ポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノラウレート、ポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノステアレート、ポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノパルミテート、ポリオキシエチレン(20)ソルビタントリオレート、ポリオキシエチレン(8)オクチルフェニルエーテル、ポリオキシエチレン(20)コレステロールエステル、ポリオキシエチレン(30)コレステロールエステルまたはポリオキシエチレン硬化ヒマシ油である上記(1)に記載する多価金属無機塩被覆レチノイン酸ナノ粒子の粒径の調整方法;

15 である。

本発明は、さらに具体的な態様として、

(8) レチノイン酸のミセル表面を炭酸カルシウムの皮膜で被覆してなるレチノイン酸ナノ粒子の粒径の調整方法であって、

レチノイン酸の低級アルコール溶液をアルカリ水溶液と共に分散し、さらに非イオン性界面活性剤を添加することにより調製した混合ミセルに、塩化カルシウムおよび炭酸ナトリウムを、モル比で1:0~1.0の範囲内で添加することによりミセル表面に炭酸カルシウムの皮膜を形成し、その平均粒子径を5~300nmの範囲内とすることを特徴とする請求の範囲第1項に記載する炭酸カルシウム被覆レチノイン酸ナノ粒子の粒径の調整方法;

25 (9) 低級アルコールがメタノールまたはエタノールである上記(8)に記載する炭酸カルシウム被覆レチノイン酸ナノ粒子の粒径の調整方法;

(10) 非イオン性界面活性剤が、ポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノオレート、ポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノラウレート、ポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノステアレート、ポリオキシエチレン(20)

ソルビタンモノパルミテート、ポリオキシエチレン（20）ソルビタントリオレート、ポリオキシエチレン（8）オクチルフェニルエーテル、ポリオキシエチレン（20）コレステロールエステル、ポリオキシエチレン（30）コレステロールエステルまたはポリオキシエチレン硬化ヒマシ油である上記（8）に記載する炭酸カルシウム被覆レチノイン酸ナノ粒子の粒径の調整方法；
5 である。

また本発明は、別の態様として、

- （11）上記（1）ないし（7）のいずれかに記載の調整方法により得られた平均粒子径が5～300nmを有する多価金属無機塩被覆レチノイン酸ナノ粒子；
10 （12）上記（8）ないし（10）のいずれかに記載の調整方法により得られた平均粒子径が5～300nmを有する炭酸カルシウム被覆レチノイン酸ナノ粒子；
（13）レチノイン酸のミセル表面を炭酸カルシウムの皮膜で被覆してなる平均
15 粒子径が5～300nmを有する炭酸カルシウム被覆ナノ粒子；
（14）レチノイン酸のミセル表面を炭酸亜鉛の皮膜で被覆してなる平均粒子径が5～300nmを有する炭酸亜鉛被覆レチノイン酸ナノ粒子；
（15）レチノイン酸のミセル表面をリン酸カルシウムの皮膜で被覆してなる平均
20 粒子径が5～300nmを有するリン酸カルシウム被覆レチノイン酸ナノ粒子；
である。

本発明が提供する多価金属無機塩被覆レチノイン酸ナノ粒子は、その平均粒子径が5～300nmの範囲内と、所望する極めて微細なものに調整されたものである。
25

レチノイン酸が皮下投与された場合には、その高い刺激性と脂溶性のため、投与部位に炎症もしくは腫瘍化が認められる。また水に不溶であることから、注射剤としては不向きであった。本発明が提供する多価金属無機塩被覆レチノイン酸ナノ粒子は、水に溶解した場合には透明溶液の形態を保っているため、皮下およ

び静脈内注射製剤として投与することが可能となる。また、生体適合性の多価金属無機塩の皮膜によりレチノイン酸が被覆されていることから低刺激性であり、投与部位における炎症の発生、腫瘍化などがみられない特性を有する。

さらに、本発明のナノ粒子を外用剤として皮膚に塗布投与した場合には、良好に経皮吸収され、刺激性がないことから炎症を惹起せず、ナノ粒子から徐放的にレチノイン酸が放出され、皮膚のシワとり、活性化等の効果を発揮でき、外用剤あるいは化粧品に用いることもできる。

特にレチノイン酸を皮膚に塗布した場合には、上皮細胞の増殖をもたらし、新たな皮膚再生に極めて効果的なものであり、美白、シワとりに効果的な化合物であるが、これまで皮膚刺激性のため使用されていなかった。しかしながら、多価金属無機塩を被覆したナノ粒子としたことにより、刺激性を低減し、また平均粒子径が5～300nmと微細なものであることから、皮膚浸透性が向上し、レチノイン酸の血中動態が上昇し、短時間のうちにレチノイン酸が血中に存在し、また徐放的に長時間に亘って、血中濃度を維持し得る利点を有している。

その結果、上皮細胞の増殖因子であるHB-EGF (HB-Epidermal Growth Factor) の産生量が上昇し、また、表皮内では通常短時間で産生されないヒアルロン酸の産生が誘導されることから、皮膚再生が早まることとなり、表皮の肥厚が顕著に認められる特性を有している。したがって、再生医療への応用として、極めて有用なものである。

20

図面の簡単な説明

第1図は、試験例1の(1)における、炭酸ナトリウムを添加した際の溶液の透過度変化を示した図である。

第2図は、試験例1の(2)における、塩化カルシウムに対する炭酸ナトリウムの添加モル比率を変化させ、レチノイン酸ミセルと混合してレチノイン酸-CaCO₃ナノ粒子を調製する場合のゼータ電位の変化を示した図である。

第3図は、試験例5における、メラノーマ細胞のレチノイン酸刺激による³H-チミジン取り込み量を示す図である。

第4図は、試験例6の(1)における、レチノイン酸-CaCO₃ナノ粒子および

レチノイン酸ミセルをラットに皮下投与した場合の血中放出レチノイン酸濃度の推移を示した図である。

第5図は、比較例6の(1)における、比較例であるナノ粒子化していないレチノイン酸ミセルをラットに皮下投与し、その投与後10日後の皮下投与部位の
5 写真である。

第6図は、試験例6の(1)における、レチノイン酸- CaCO_3 ナノ粒子をラットに皮下投与し、その投与後10日後の皮下投与部位の写真である。

第7図は、試験例6の(2)における、レチノイン酸- CaCO_3 ナノ粒子、レチノイン酸- ZnCO_3 ナノ粒子およびレチノイン酸をワセリン基剤に混合しマウスの
10 皮膚に塗布投与した場合の血中放出レチノイン酸濃度の推移を示した図である。

第8図は、試験例7における、各製剤を投与した時の表皮の厚さの結果を示した図である。

第9図は、試験例8における、HB-EGF mRNA産生量の比較を示した図である。

15 なお、図中において、RAはレチノイン酸を、 $\text{RA}-\text{CaCO}_3$ はレチノイン酸- CaCO_3 ナノ粒子を、 $\text{RA}-\text{ZnCO}_3$ はレチノイン酸- ZnCO_3 ナノ粒子を、 $\text{RA}-\text{Ca}$ はレチノイン酸-Caナノ粒子を、 $\text{RA}-\text{Zn}$ はレチノイン酸-Znナノ粒子を意味する。

20 発明を実施するための最良の形態

本発明で使用するレチノイン酸は、生理学的には、視覚、聴覚、生殖などの機能保持、成長促進、皮膚や粘膜などの正常保持、制ガン作用等を有し、急性前骨髄球性白血病 (APL: acute promyelocytic leukemia) の治療薬として臨床的に使用されている全トランス体レチノイン酸 (*all-trans* retinoic acid) である。

25 この多価金属無機塩を被覆したレチノイン酸のナノ粒子の調製は、詳細には以下のようにして行われる。

レチノイン酸は、脂溶性化合物であり、また分子内にカルボン酸を有していることから、アルカリ水溶液、例えば水酸化ナトリウム水溶液および少量の低級アルコールを添加することにより、水溶液中で球状のミセルが形成される。このミ

セルの表面は、マイナス荷電で覆われた状態となっているため、容易に2価金属イオン、たとえばカルシウムイオン (Ca^{2+}) が吸着 (結合) し、ナトリウムイオンとの交換反応が生じる。この場合、2価金属イオンはナトリウムイオンに比較して吸着力 (結合力) が高いことから、2価金属イオンを吸着したミセルは、

5 その表面の荷電は解離しにくくなり、水に不溶化して、ミセルは沈殿する。沈殿を生じると、粒子同士の凝集が生じ、非常に大きな粒子を形成することとなる。

したがって、この段階での粒子同士の凝集を防ぐために、非イオン性界面活性剤、例えば、ポリオキシエチレン (20) ソルビタンモノオレート (Tween 80) をレチノイン酸と共に添加する。すなわち、Tween 80 は、レチノイン酸と共に混

10 合ミセルを形成し、ミセル表面上にポリオキシエチレン鎖を突出させているため、多価金属イオンがミセル表面に吸着 (結合) しても、ミセル表面に突出した親水基としてのポリオキシエチレン鎖の存在により、ミセルの沈殿が生じないこととなる。

次いで、2価金属ハロゲン化物または酢酸化物、例えば塩化カルシウムを添加

15 する。この場合の2価金属ハロゲン化物または酢酸化物の添加量は、レチノイン酸のミセル表面に2価金属イオンを吸着させるに十分な量であればよい。2価の金属イオンはナトリウムイオンより吸着力 (結合力) が強く、ナトリウムイオンとの交換が生じる。その結果、2価金属イオンが優先的に吸着 (結合) することとなり、ミセル表面が2価金属イオンで覆われた球状もしくは卵形等のミセルが

20 形成される。そこに、さらにアルカリ金属炭酸化物またはアルカリ金属リン酸化物を添加すると、ミセル表面電荷は完全に中和されていないために、さらに炭酸イオン (CO_3^{2-}) あるいはリン酸イオン (PO_4^{2-}) が表面にある2価金属イオンに吸着 (結合) する。この結果、レチノイン酸のミセル表面に多価金属無機塩の皮膜が形成されることとなり、多価金属無機塩被覆レチノイン酸ナノ粒子が

25 調製される。

かかる多価金属無機塩被覆ナノ粒子における多価金属無機塩としては、生体適合性を有する炭酸カルシウム、炭酸亜鉛またはリン酸カルシウムをあげることができる。

したがって、2価の金属ハロゲン化物または酢酸化物としては、カルシウムハ

ロゲン化物、亜鉛ハロゲン化物、酢酸カルシウムまたは酢酸亜鉛であり、カルシウムハロゲン化物および亜鉛ハロゲン化物としては、具体的には、塩化カルシウム、臭化カルシウム、フッ化カルシウム、ヨウ化カルシウム、塩化亜鉛、臭化亜鉛、フッ化亜鉛およびヨウ化亜鉛をあげることができる。

- 5 また、アルカリ金属炭酸化物またはアルカリ金属リン酸化物としては、炭酸ナトリウム、炭酸カリウム、リン酸ナトリウムおよびリン酸カリウムをあげることができる。

一方、ナノ粒子の調製に使用する低級アルコールとしては、メタノールあるいはエタノールをあげることができる。

- 10 また、非イオン性界面活性剤としては、例えば、ポリオキシエチレン（20）ソルビタンモノオレート（Tween 80）、ポリオキシエチレン（20）ソルビタンモノラウレート（Tween 20）、ポリオキシエチレン（20）ソルビタンモノステアレート（Tween 60）、ポリオキシエチレン（20）ソルビタンモノパルミテート（Tween 40）、ポリオキシエチレン（20）ソルビタントリオレート（Tween 85）、ポリオ
15 キシエチレン（8）オクチルフェニルエーテル、ポリオキシエチレン（20）コレステロールエステルおよびポリオキシエチレン硬化ヒマシ油をあげることができる。

- 20 以上の方法により調製された多価金属無機塩被覆レチノイン酸ナノ粒子は、微細なナノ粒子ではあるが、その粒度分布は幅広く、10～3000 nm程度の粒子径（直径）を有するものであった。

- ところで、多価金属無機塩被覆レチノイン酸ナノ粒子を皮下投与あるいは静脈内投与する場合、またさらに皮膚投与してレチノイン酸を経皮吸収させる場合には、その粒径は5～300 nm程度の極めて微細なナノ粒子であることが好まし
25 い。したがって目的とする多価金属無機塩被覆レチノイン酸ナノ粒子について、その粒径が5～300 nm程度の極めて微細なナノ粒子に調整する必要がある。

かかる粒子径の調整は、レチノイン酸のミセルの表面に形成させるために添加する、2価金属ハロゲン化物または酢酸化物と、アルカリ金属炭酸化物またはリン酸化物とのモル比を変化させることにより行い得ることが判明した。

すなわち、レチノイン酸のミセル表面への多価金属無機塩の皮膜の形成は、アルカリ（具体的にはナトリウム）水溶液中で形成されたミセルの表面のマイナス荷電を、2価金属ハロゲン化物または酢酸化物による2価金属イオン、例えばカルシウムイオン（ Ca^{2+} ）との交換反応、およびアルカリ金属炭酸化物あるいはリン酸化物による炭酸イオン（ CO_3^{2-} ）またはリン酸イオン（ PO_4^{2-} ）とによる中和で行われる。

具体的には、添加する2価金属ハロゲン化物または酢酸化物と、アルカリ金属炭酸化物あるいはリン酸化物の両者の比率を、モル比で1 : 0 ~ 1.0の範囲内で添加することにより、ミセル表面に多価金属無機塩の皮膜を形成し、所望により超音波処理等の機械的振動を加え、その平均粒子径を5 ~ 300 nmの範囲内とすることが可能となった。

アルカリ金属炭酸化物あるいはリン酸化物を、2価金属ハロゲン化物または酢酸化物1モルに対し1.0モルを超えて添加した場合には、ミセル表面上に多価金属無機塩の皮膜の形成は生じるものの、粒径が大きなものとなり、粒子同士の凝集が生じてしまい、超音波処理等の機械的振動を加えても所望の平均粒子径を有するナノ粒子を得ることができず、好ましいものではない。

しかしながら、添加する2価金属ハロゲン化物または酢酸化物と、アルカリ金属炭酸化物またはリン酸化物との両者の比率を、モル比を1 : 0 ~ 1.0の範囲内で添加した場合には、ミセル表面に多価金属無機塩の皮膜が形成され、そのうえで平均粒子径を5 ~ 300 nmの範囲内とすることが可能となったのである。

なお、得られたナノ粒子は凝集体として存在している場合もあり、この場合にはかかる凝集体を超音波処理等の機械的振動を与えることにより、極めて均一な平均粒子径を有するナノ粒子に調製し得ることが判明した。したがって、本発明のナノ粒子にはそのような凝集体をも包含し、かつ上記の方法によるナノ粒子の調製を行った後、さらに超音波処理等の機械的振動を加える平均粒子径の調整を行う方法でもある。

以上のようにして調製された本発明が提供する多価金属無機塩被覆レチノイン酸ナノ粒子は、水に溶解した場合に透明溶液の形態を保つものであり、多価金属

無機塩の皮膜によりレチノイン酸が被覆されていることから低刺激性であり、皮下および静脈内注射製剤として投与することが可能となる。また、投与部位における炎症の発生、腫瘍化などがみられない。

さらに、外用剤として皮膚に塗布投与した場合には、良好に経皮吸収され、刺激性がないことから炎症を惹起せず、ナノ粒子から徐放的にレチノイン酸が放出され、皮膚のシワとり、活性化等の効果を発揮できるのである。

それらの点を含め、以下の試験例により、本発明を詳細に説明する。

なお、本発明が提供する多価金属無機塩被覆レチノイン酸ナノ粒子において、炭酸カルシウム被覆レチノイン酸ナノ粒子を「レチノイン酸- CaCO_3 ナノ粒子」と、炭酸亜鉛被覆レチノイン酸ナノ粒子を「レチノイン酸- ZnCO_3 ナノ粒子」と、またリン酸カルシウム被覆レチノイン酸ナノ粒子を「レチノイン酸- CaPO_4 ナノ粒子」と記載する場合もある。

試験例 1：レチノイン酸- CaCO_3 ナノ粒子の作製

レチノイン酸 13.6 mg を 900 μL のエタノール（またはメタノール）に溶解し、この溶液に 0.5 N- NaOH 水溶液の 100 μL を加えた。このときの pH は、7 ~ 7.5 であった。この溶液を母液として 100 μL 採取し、これを Tween 80 を含む蒸留水 100 μL に加え、よく攪拌した。

約 30 分後に、5 M-塩化カルシウム含有水溶液を加え攪拌し、さらに 30 分後に 1 M-炭酸ナトリウム含有水溶液を加え、さらに攪拌した。一昼夜攪拌を継続した後、得られた溶液を一夜凍結乾燥し、目的とする炭酸カルシウム被覆レチノイン酸ナノ粒子を作製した。

なお、試験に使用したレチノイン酸- CaCO_3 ナノ粒子は、凍結乾燥後のナノ粒子を注射用蒸留水で所定の濃度に再分散させ、使用した。

(1) 炭酸ナトリウムを添加した際における溶液の透過度の変化

上記の 5 M-塩化カルシウム含有水溶液および 1 M-炭酸ナトリウム含有水溶液の添加に際し、5 M-塩化カルシウム含有水溶液を 15 μL 添加し、それに対応して 1 M-炭酸ナトリウム含有水溶液の添加量を変化させることにより、塩化カルシウムに対する炭酸ナトリウムのモル比を変化させ、溶液の透過度変化を観

察した。

透過度は、280 nmにおける透過性（数値が大きいほど透明性が高い）で評価し、その結果を第1図に示した。

5 図中に示した結果からも判明するように、炭酸ナトリウムを添加するにしたがって、溶液は徐々に濁り始め、最終的には沈澱が観察された。沈澱が観察される領域では、溶液は、炭酸ナトリウムの添加直後から30分までは透明もしくはやや白濁状態であるが、それ以上の攪拌では沈澱が生じ始め、そのため上清液の濁度が上昇した。

10 以上の事実から、レチノイン酸ミセルに対する塩化カルシウムおよび炭酸ナトリウムの添加モル比率を変化させることにより、得られるナノ粒子の粒径の調整が行い得ることが示唆された。

(2) 塩化カルシウムに対する炭酸ナトリウムのモル比の変化によるゼータ電位変化の測定

15 塩化カルシウムに対する炭酸ナトリウムの添加モル比率を変化させ、レチノイン酸ミセルと混合してレチノイン酸-CaCO₃ナノ粒子を調製する場合のゼータ電位の変化を測定した。

その結果を第2図に示した。

20 なお、レチノイン酸ミセルに対する塩化カルシウムのみを添加した場合のゼータ電位は+1.66 mVであり、レチノイン酸ミセルとしてのゼータ電位は-68.5 mVであった。したがって、カルシウムイオンがミセル表面に吸着していることは明らかである。

第2図の結果からも判明するように、塩化カルシウムに対する炭酸ナトリウムのモル比を変化させることにより、ゼータ電位が変化している。炭酸ナトリウムの添加モル比が塩化カルシウム1モルに対し0.2モルまでの場合には、なだらかなゼータ電位の減少を示しているが、0.2モルを超えると急激に低下していることから、炭酸イオンの吸着が飽和に達しているか、もしくは粒子同士の凝集がはじまっていることを示唆している。

試験例 2 : レチノイン酸-CaCO₃ ナノ粒子の粒子径の調整に及ぼす、塩化カルシウムに対する炭酸ナトリウムの添加モル比率等の検討

(1) 添加モル比の検討

- 上記した試験例 1 の結果から、塩化カルシウムおよび炭酸ナトリウムのモル比を
5 変化させたレチノイン酸のミセルに添加することにより、レチノイン酸-CaCO₃
ナノ粒子の粒子径が調整され得ることが判明した。

したがって次に、塩化カルシウムおよび炭酸ナトリウムのモル比を変化させて
レチノイン酸のミセルに添加させることにより得られるレチノイン酸-CaCO₃ ナ
ノ粒子の粒子径の変化について検討した。

- 10 その結果、塩化カルシウム 1 モルに対して炭酸ナトリウムを 0. 2 モルまでの
範囲内で添加した場合には、得られるレチノイン酸-CaCO₃ ナノ粒子の粒径は 1
0 ~ 5 0 nm の値を有するものであった。

- また、塩化カルシウム 1 モルに対して、炭酸ナトリウムの添加量を 0. 2 モル
を超える範囲とした場合には、得られるレチノイン酸-CaCO₃ ナノ粒子の粒径は、
15 3 5 0 nm 以上を有するものであり、これは微細なナノ粒子が凝集して、凝集塊
として大きな平均粒子径を有する値を示しているものであった。

これらの事実は、上記試験例 1 の (2) のゼータ電位の変化と一致するもので
あった。

- したがって、この凝集塊が超音波処理により微細なナノ粒子に分散しうるもの
20 であるかを以下に検討した。

(2) 超音波処理を行ったレチノイン酸-CaCO₃ ナノ粒子の流体力学的直径の測
定

上記で得られたレチノイン酸-CaCO₃ ナノ粒子について、調製後 5 分間超音波
処理を施した後の粒子径を測定した。

- 25 その結果、塩化カルシウム 1 モルに対して炭酸ナトリウムを 1. 0 モルまでの
範囲内で添加した場合には、得られるレチノイン酸-CaCO₃ ナノ粒子の凝集塊は、
超音波処理により分散し、それぞれ粒径が 3 0 0 nm のまでのナノ粒子に分散し
た。しかしながら、塩化カルシウム 1 モルに対して炭酸ナトリウムを 2. 0 モル
および 3. 0 モル添加させて得たレチノイン酸-CaCO₃ ナノ粒子の凝集塊 (平均粒

子径：約2700nmおよび2200nm）は、超音波処理しても、その凝集塊を分散させることができなかった。

これらの結果をまとめて表1に示した。

5 第1表：ナノ粒子の粒径に及ぼす塩化カルシウムおよび炭酸ナトリウムの比率

	レチノイン酸-CaCO ₃ ナノ粒子の平均 粒子径(直径：nm)				
CaCl ₂ /NaCO ₃ のモル比	1/0	1/0.01	1/0.1	1/0.2	1/0.3
調製直後の平均粒子径 (nm)	20.2	23	17.3	30.3	356.3
超音波処理後の平均粒子径(nm)	—	—	—	22.4	33.3
CaCl ₂ /NaCO ₃ のモル比	1/0.5	1/1.0	1/2.0	1/3.0	
調製直後の平均粒子径 (nm)	1316.2	1450	2687.3	2240.5	
超音波処理後の平均粒子径(nm)	41.1	106.4	2197.3	1349.4	

以上の事実からみれば、本発明においては、塩化カルシウムおよび炭酸ナトリウムをモル比で1：0～1.0の範囲内で添加させてレチノイン酸ミセルの表面に炭酸カルシウム皮膜を形成させ、さらに超音波処理を施すことにより、レチノイン酸-CaCO₃ナノ粒子の平均粒子径の調整が極めて効果的であることが理解される。

10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65 70 75 80 85 90 95 100 105 110 115 120 125 130 135 140 145 150 155 160 165 170 175 180 185 190 195 200 205 210 215 220 225 230 235 240 245 250 255 260 265 270 275 280 285 290 295 300 305 310 315 320 325 330 335 340 345 350 355 360 365 370 375 380 385 390 395 400 405 410 415 420 425 430 435 440 445 450 455 460 465 470 475 480 485 490 495 500 505 510 515 520 525 530 535 540 545 550 555 560 565 570 575 580 585 590 595 600 605 610 615 620 625 630 635 640 645 650 655 660 665 670 675 680 685 690 695 700 705 710 715 720 725 730 735 740 745 750 755 760 765 770 775 780 785 790 795 800 805 810 815 820 825 830 835 840 845 850 855 860 865 870 875 880 885 890 895 900 905 910 915 920 925 930 935 940 945 950 955 960 965 970 975 980 985 990 995 1000 1005 1010 1015 1020 1025 1030 1035 1040 1045 1050 1055 1060 1065 1070 1075 1080 1085 1090 1095 1100 1105 1110 1115 1120 1125 1130 1135 1140 1145 1150 1155 1160 1165 1170 1175 1180 1185 1190 1195 1200 1205 1210 1215 1220 1225 1230 1235 1240 1245 1250 1255 1260 1265 1270 1275 1280 1285 1290 1295 1300 1305 1310 1315 1320 1325 1330 1335 1340 1345 1350 1355 1360 1365 1370 1375 1380 1385 1390 1395 1400 1405 1410 1415 1420 1425 1430 1435 1440 1445 1450 1455 1460 1465 1470 1475 1480 1485 1490 1495 1500 1505 1510 1515 1520 1525 1530 1535 1540 1545 1550 1555 1560 1565 1570 1575 1580 1585 1590 1595 1600 1605 1610 1615 1620 1625 1630 1635 1640 1645 1650 1655 1660 1665 1670 1675 1680 1685 1690 1695 1700 1705 1710 1715 1720 1725 1730 1735 1740 1745 1750 1755 1760 1765 1770 1775 1780 1785 1790 1795 1800 1805 1810 1815 1820 1825 1830 1835 1840 1845 1850 1855 1860 1865 1870 1875 1880 1885 1890 1895 1900 1905 1910 1915 1920 1925 1930 1935 1940 1945 1950 1955 1960 1965 1970 1975 1980 1985 1990 1995 2000 2005 2010 2015 2020 2025 2030 2035 2040 2045 2050 2055 2060 2065 2070 2075 2080 2085 2090 2095 2100 2105 2110 2115 2120 2125 2130 2135 2140 2145 2150 2155 2160 2165 2170 2175 2180 2185 2190 2195 2200 2205 2210 2215 2220 2225 2230 2235 2240 2245 2250 2255 2260 2265 2270 2275 2280 2285 2290 2295 2300 2305 2310 2315 2320 2325 2330 2335 2340 2345 2350 2355 2360 2365 2370 2375 2380 2385 2390 2395 2400 2405 2410 2415 2420 2425 2430 2435 2440 2445 2450 2455 2460 2465 2470 2475 2480 2485 2490 2495 2500 2505 2510 2515 2520 2525 2530 2535 2540 2545 2550 2555 2560 2565 2570 2575 2580 2585 2590 2595 2600 2605 2610 2615 2620 2625 2630 2635 2640 2645 2650 2655 2660 2665 2670 2675 2680 2685 2690 2695 2700 2705 2710 2715 2720 2725 2730 2735 2740 2745 2750 2755 2760 2765 2770 2775 2780 2785 2790 2795 2800 2805 2810 2815 2820 2825 2830 2835 2840 2845 2850 2855 2860 2865 2870 2875 2880 2885 2890 2895 2900 2905 2910 2915 2920 2925 2930 2935 2940 2945 2950 2955 2960 2965 2970 2975 2980 2985 2990 2995 3000 3005 3010 3015 3020 3025 3030 3035 3040 3045 3050 3055 3060 3065 3070 3075 3080 3085 3090 3095 3100 3105 3110 3115 3120 3125 3130 3135 3140 3145 3150 3155 3160 3165 3170 3175 3180 3185 3190 3195 3200 3205 3210 3215 3220 3225 3230 3235 3240 3245 3250 3255 3260 3265 3270 3275 3280 3285 3290 3295 3300 3305 3310 3315 3320 3325 3330 3335 3340 3345 3350 3355 3360 3365 3370 3375 3380 3385 3390 3395 3400 3405 3410 3415 3420 3425 3430 3435 3440 3445 3450 3455 3460 3465 3470 3475 3480 3485 3490 3495 3500 3505 3510 3515 3520 3525 3530 3535 3540 3545 3550 3555 3560 3565 3570 3575 3580 3585 3590 3595 3600 3605 3610 3615 3620 3625 3630 3635 3640 3645 3650 3655 3660 3665 3670 3675 3680 3685 3690 3695 3700 3705 3710 3715 3720 3725 3730 3735 3740 3745 3750 3755 3760 3765 3770 3775 3780 3785 3790 3795 3800 3805 3810 3815 3820 3825 3830 3835 3840 3845 3850 3855 3860 3865 3870 3875 3880 3885 3890 3895 3900 3905 3910 3915 3920 3925 3930 3935 3940 3945 3950 3955 3960 3965 3970 3975 3980 3985 3990 3995 4000 4005 4010 4015 4020 4025 4030 4035 4040 4045 4050 4055 4060 4065 4070 4075 4080 4085 4090 4095 4100 4105 4110 4115 4120 4125 4130 4135 4140 4145 4150 4155 4160 4165 4170 4175 4180 4185 4190 4195 4200 4205 4210 4215 4220 4225 4230 4235 4240 4245 4250 4255 4260 4265 4270 4275 4280 4285 4290 4295 4300 4305 4310 4315 4320 4325 4330 4335 4340 4345 4350 4355 4360 4365 4370 4375 4380 4385 4390 4395 4400 4405 4410 4415 4420 4425 4430 4435 4440 4445 4450 4455 4460 4465 4470 4475 4480 4485 4490 4495 4500 4505 4510 4515 4520 4525 4530 4535 4540 4545 4550 4555 4560 4565 4570 4575 4580 4585 4590 4595 4600 4605 4610 4615 4620 4625 4630 4635 4640 4645 4650 4655 4660 4665 4670 4675 4680 4685 4690 4695 4700 4705 4710 4715 4720 4725 4730 4735 4740 4745 4750 4755 4760 4765 4770 4775 4780 4785 4790 4795 4800 4805 4810 4815 4820 4825 4830 4835 4840 4845 4850 4855 4860 4865 4870 4875 4880 4885 4890 4895 4900 4905 4910 4915 4920 4925 4930 4935 4940 4945 4950 4955 4960 4965 4970 4975 4980 4985 4990 4995 5000 5005 5010 5015 5020 5025 5030 5035 5040 5045 5050 5055 5060 5065 5070 5075 5080 5085 5090 5095 5100 5105 5110 5115 5120 5125 5130 5135 5140 5145 5150 5155 5160 5165 5170 5175 5180 5185 5190 5195 5200 5205 5210 5215 5220 5225 5230 5235 5240 5245 5250 5255 5260 5265 5270 5275 5280 5285 5290 5295 5300 5305 5310 5315 5320 5325 5330 5335 5340 5345 5350 5355 5360 5365 5370 5375 5380 5385 5390 5395 5400 5405 5410 5415 5420 5425 5430 5435 5440 5445 5450 5455 5460 5465 5470 5475 5480 5485 5490 5495 5500 5505 5510 5515 5520 5525 5530 5535 5540 5545 5550 5555 5560 5565 5570 5575 5580 5585 5590 5595 5600 5605 5610 5615 5620 5625 5630 5635 5640 5645 5650 5655 5660 5665 5670 5675 5680 5685 5690 5695 5700 5705 5710 5715 5720 5725 5730 5735 5740 5745 5750 5755 5760 5765 5770 5775 5780 5785 5790 5795 5800 5805 5810 5815 5820 5825 5830 5835 5840 5845 5850 5855 5860 5865 5870 5875 5880 5885 5890 5895 5900 5905 5910 5915 5920 5925 5930 5935 5940 5945 5950 5955 5960 5965 5970 5975 5980 5985 5990 5995 6000 6005 6010 6015 6020 6025 6030 6035 6040 6045 6050 6055 6060 6065 6070 6075 6080 6085 6090 6095 6100 6105 6110 6115 6120 6125 6130 6135 6140 6145 6150 6155 6160 6165 6170 6175 6180 6185 6190 6195 6200 6205 6210 6215 6220 6225 6230 6235 6240 6245 6250 6255 6260 6265 6270 6275 6280 6285 6290 6295 6300 6305 6310 6315 6320 6325 6330 6335 6340 6345 6350 6355 6360 6365 6370 6375 6380 6385 6390 6395 6400 6405 6410 6415 6420 6425 6430 6435 6440 6445 6450 6455 6460 6465 6470 6475 6480 6485 6490 6495 6500 6505 6510 6515 6520 6525 6530 6535 6540 6545 6550 6555 6560 6565 6570 6575 6580 6585 6590 6595 6600 6605 6610 6615 6620 6625 6630 6635 6640 6645 6650 6655 6660 6665 6670 6675 6680 6685 6690 6695 6700 6705 6710 6715 6720 6725 6730 6735 6740 6745 6750 6755 6760 6765 6770 6775 6780 6785 6790 6795 6800 6805 6810 6815 6820 6825 6830 6835 6840 6845 6850 6855 6860 6865 6870 6875 6880 6885 6890 6895 6900 6905 6910 6915 6920 6925 6930 6935 6940 6945 6950 6955 6960 6965 6970 6975 6980 6985 6990 6995 7000 7005 7010 7015 7020 7025 7030 7035 7040 7045 7050 7055 7060 7065 7070 7075 7080 7085 7090 7095 7100 7105 7110 7115 7120 7125 7130 7135 7140 7145 7150 7155 7160 7165 7170 7175 7180 7185 7190 7195 7200 7205 7210 7215 7220 7225 7230 7235 7240 7245 7250 7255 7260 7265 7270 7275 7280 7285 7290 7295 7300 7305 7310 7315 7320 7325 7330 7335 7340 7345 7350 7355 7360 7365 7370 7375 7380 7385 7390 7395 7400 7405 7410 7415 7420 7425 7430 7435 7440 7445 7450 7455 7460 7465 7470 7475 7480 7485 7490 7495 7500 7505 7510 7515 7520 7525 7530 7535 7540 7545 7550 7555 7560 7565 7570 7575 7580 7585 7590 7595 7600 7605 7610 7615 7620 7625 7630 7635 7640 7645 7650 7655 7660 7665 7670 7675 7680 7685 7690 7695 7700 7705 7710 7715 7720 7725 7730 7735 7740 7745 7750 7755 7760 7765 7770 7775 7780 7785 7790 7795 7800 7805 7810 7815 7820 7825 7830 7835 7840 7845 7850 7855 7860 7865 7870 7875 7880 7885 7890 7895 7900 7905 7910 7915 7920 7925 7930 7935 7940 7945 7950 7955 7960 7965 7970 7975 7980 7985 7990 7995 8000 8005 8010 8015 8020 8025 8030 8035 8040 8045 8050 8055 8060 8065 8070 8075 8080 8085 8090 8095 8100 8105 8110 8115 8120 8125 8130 8135 8140 8145 8150 8155 8160 8165 8170 8175 8180 8185 8190 8195 8200 8205 8210 8215 8220 8225 8230 8235 8240 8245 8250 8255 8260 8265 8270 8275 8280 8285 8290 8295 8300 8305 8310 8315 8320 8325 8330 8335 8340 8345 8350 8355 8360 8365 8370 8375 8380 8385 8390 8395 8400 8405 8410 8415 8420 8425 8430 8435 8440 8445 8450 8455 8460 8465 8470 8475 8480 8485 8490 8495 8500 8505 8510 8515 8520 8525 8530 8535 8540 8545 8550 8555 8560 8565 8570 8575 8580 8585 8590 8595 8600 8605 8610 8615 8620 8625 8630 8635 8640 8645 8650 8655 8660 8665 8670 8675 8680 8685 8690 8695 8700 8705 8710 8715 8720 8725 8730 8735 8740 8745 8750 8755 8760 8765 8770 8775 8780 8785 8790 8795 8800 8805 8810 8815 8820 8825 8830 8835 8840 8845 8850 8855 8860 8865 8870 8875 8880 8885 8890 8895 8900 8905 8910 8915 8920 8925 8930 8935 8940 8945 8950 8955 8960 8965 8970 8975 8980 8985 8990 8995 9000 9005 9010 9015 9020 9025 9030 9035 9040 9045 9050 9055 9060 9065 9070 9075 9080 9085 9090 9095 9100 9105 9110 9115 9120 9125 9130 9135 9140 9145 9150 9155 9160 9165 9170 9175 9180 9185 9190 9195 9200 9205 9210 9215 9220 9225 9230 9235 9240 9245 9250 9255 9260 9265 9270 9275 9280 9285 9290 9295 9300 9305 9310 9315 9320 9325 9330 9335 9340 9345 9350 9355 9360 9365 9370 9375 9380 9385 9390 9395 9400 9405 9410 9415 9420 9425 9430 9435 9440 9445 9450 9455 9460 9465 9470 9475 9480 9485 9490 9495 9500 9505 9510 9515 9520 9525 9530 9535 9540 9545 9550 9555 9560 9565 9570 9575 9580 9585 9590 9595 9600 9605 9610 9615 9620 9625 9630 9635 9640 9645 9650 9655 9660 9665 9670 9675 9680 9685 9690 9695 9700 9705 9710 9715 9720 9725 9730 9735 9740 9745 9750 9755 9760 9765 9770 9775 9780 9785 9790 9795 9800 9805 9810 9815 9820 9825 9830 9835 9840 9845 9850 9855 9860 9865 9870 9875 9880 9885 9890 9895 9900 9905 9910 9915 9920 9925 9930 9935 9940 9945 9950 9955 9960 9965 9970 9975 9980 9985 9990 9995 10000 10005 10010 10015 10020 10025 10030 10035 10040 10045 10050 10055 10060 10065 10070 10075 10080 10085 10090 10095 10100 10105 10110 10115 10120 10125 10130 10135 10140 10145 10150 10155 10160 10165 10170 10175 10180 10185 10190 10195 10200 10205 10210 10215 10220 10225 10230 10235 10240 10245 10250 10255 10260 10265 10270 10275 10280 10285 10290 10295 10300 10305 10310 10315 10320 10325 10330 10335 10340 10345 10350 10355 10360 10365 10370 10375 10380 10385 10390 10395 10400 10405 10410 10415 10420 10425 10430 10435 10440 10445 10450 10455 10460 10465 10470 10475 10480 10485 10490 10495 10500 10505 10510 10515 10520 10525 10530 10535 10540 10545 10550 10555 10560 10565 10570 10575 10580 10585 10590 10595 10600 10605 10610 10615 10620 10625 10630 10635 10640 10645 10650 10655 10660 10665 10670 10675 10680 10685 10690 10695 10700 10705 10710 10715 10720 10725 10730 10735 10740 10745 10750 10755 10760 10765 10770 10775 10780 10785 10790 10795 10800 10805 10810 10815 10820 10825 10830 10835 10840 10845 10850 10855 10860 10865 10870 10875 10880 10885 10890 10895 10900 10905 10910 10915 10920 10925 10930 10935 10940 10945 10950 10955 10960 10965 10970 10975 10980 10985 10990 10995 11000 11005 11010 11015 11020 11025 11030 11035 11040 11045 11050 11055 11060 11065 11070 11075 11080 11085 11090 11095 11100 11105 11110 11115 11120 11125 11130 11135 11140 11145 11150 11155 11160 11165 11170 11175 11180 11185 11190 11195 11200 11205 11210 11215 11220 11225 11230 11235 11240 11245 11250 11255 11260 11265 11270 11275 11280 11285 11290 11295 11300 11305 11310 11315 11320 11325 11330 11335 11

試験例 3 : レチノイン酸-ZnCO₃ ナノ粒子の作製

レチノイン酸 13.6 mg を 900 μ L のエタノールに溶解して、この溶液に 0.5 N-NaOH 水溶液の 100 μ L を加えた。このときの pH は、7 ~ 7.5 であった。この溶液を母液として 100 μ L 採取し、これを Tween 80 を含む蒸留水 100 μ L に加え、よく攪拌した。

約 30 分後に、5 M-酢酸亜鉛含有水溶液を加え攪拌し、さらに 30 分後に 1 M-炭酸ナトリウム含有水溶液を加え、さらに攪拌した。一昼夜攪拌を継続した後、得られた溶液を一夜凍結乾燥し、目的とする炭酸亜鉛被覆レチノイン酸ナノ粒子 (レチノイン酸-ZnCO₃ ナノ粒子) を作製した。

- 10 作製されたレチノイン酸-ZnCO₃ ナノ粒子の粒子径は、上記の試験例 1 および 2 と同様の挙動を示すものであった。

なお、試験に使用したレチノイン酸-ZnCO₃ ナノ粒子は、凍結乾燥後のナノ粒子を注射用蒸留水で所定の濃度に再分散させ、使用した。

15 試験例 4 : レチノイン酸-CaPO₄ ナノ粒子の作製

レチノイン酸 13.6 mg を 900 μ L のエタノールに溶解して、この溶液に 0.5 N-NaOH 水溶液の 100 μ L を加えた。このときの pH は、7 ~ 7.5 であった。この溶液を母液として 100 μ L 採取し、これを Tween 80 を含む蒸留水 100 μ L に加え、よく攪拌した。

- 20 約 30 分後に、5 M-塩化カルシウム含有水溶液を加え攪拌し、さらに 30 分後に 1 M-リン酸ナトリウム含有水溶液を加え、さらに攪拌した。一昼夜攪拌を継続した後、得られた溶液を一夜凍結乾燥し、目的とするリン酸カルシウム被覆レチノイン酸ナノ粒子 (レチノイン酸-CaPO₄ ナノ粒子) を作製した。

- 25 作製されたレチノイン酸-CaPO₄ ナノ粒子の粒子径も、上記の試験例 1 および 2 と同様の挙動を示すものであった。

以上のようにして調製された、本発明が提供する多価金属無機塩被覆レチノイン酸ナノ粒子の薬理作用の確認と、その粒子径が及ぼす薬理効果を確認するために、以下の生物学的試験を行った。

最初に、多価金属無機塩被覆レチノイン酸ナノ粒子として、塩化カルシウムおよび炭酸ナトリウムをモル比で1 : 1.0で添加することにより、レチノイン酸ミセルの表面に炭酸カルシウム皮膜を形成させて得たレチノイン酸-CaCO₃ナノ粒子のメラノーマ細胞に対する増殖抑制効果検討した。

5 試験例5 : *in vitro* 実験-レチノイン酸-CaCO₃ナノ粒子の B16 melanoma 細胞への添加実験

レチノイン酸が、B16 melanoma 細胞に対して増殖抑制効果があることはよく知られている。本試験例により本発明が提供するレチノイン酸-CaCO₃ナノ粒子であっても、その B16 melanoma 細胞に対して増殖抑制効果があるかどうか、またその効果は、ナノ粒子化しないレチノイン酸単独に比較して、どのように効果的なものであるかを検討するため、以下の試験を行った。

(方法)

B16 melanoma 細胞 (2×10^4) を24時間培養した。その後、レチノイン酸および上記のレチノイン酸-CaCO₃ナノ粒子を、培地に添加した。その後さらに48時間培養を行い、³H-チミジン (³H-thymidine) の取り込み量を測定し、B16 melanoma 細胞のDNA合成能を比較した。

(結果)

その結果を第3図に示した。図中に示した結果からも判明するように、本発明のレチノイン酸-CaCO₃ナノ粒子は、その添加量の増加にしたがって、ナノ粒子化しないレチノイン酸単独添加よりも、高い増殖抑制効果を示すことが理解される。

したがって、レチノイン酸をナノ粒子化した本発明のレチノイン酸-CaCO₃ナノ粒子は、B16 melanoma 細胞に対して極めて効果的に増殖抑制効果を発揮するものであることが判明した。

25 試験例6 : *in vivo* 実験-ラットに皮下投与した場合の血中動態試験

(1) 皮下投与の場合

(方法)

Wistar 系ラット (7週齢/雄性) を使用し、ラットの皮下にトリチウム (³H)

ラベルのレチノイン酸およびトリチウム (^3H) ラベルのレチノイン酸のミセルから得たレチノイン酸- CaCO_3 ナノ粒子を投与した。その後時間ごとに血液を採取し、血中のレチノイン酸の量を、シンチレーションカウンターにて測定した。

5 なお、試験にはレチノイン酸- CaCO_3 ナノ粒子（平均粒子径：150 nm）を使用した。

また、比較例としてのレチノイン酸は、ナノ粒子化していない、レチノイン酸ミセルとして投与した。

（結果）

10 第4図に、レチノイン酸- CaCO_3 ナノ粒子（平均粒子径：約150 nm）を皮下投与した場合の結果を、比較例であるナノ粒子化しないレチノイン酸ミセルの場合と比較して示した。

15 図中の結果からも判明するように、比較例であるナノ粒子化しないレチノイン酸ミセルの場合には、投与後約1時間でレチノイン酸が血中に放出されてしまうのに対して、レチノイン酸- CaCO_3 ナノ粒子の場合は、初期血中濃度が抑えられ
ると共に、持続的であり、レチノイン酸のナノ粒子からの放出は約7日間継続していた。

以上の結果から、レチノイン酸- CaCO_3 ナノ粒子は、レチノイン酸の徐放化効果が顕著に認められており、徐放化製剤として極めて有効なものであることが確認された。

20 また、第5図および第6図に投与10日後の投与皮下部位の写真を示した。第5図は比較例であるナノ粒子化しないレチノイン酸ミセルを投与した場合の写真であり、第6図はレチノイン酸- CaCO_3 ナノ粒子を投与した場合の写真である。
レチノイン酸ミセルを投与した場合には、レチノイン酸の刺激性により投与部位で炎症を起しているが、レチノイン酸- CaCO_3 ナノ粒子を投与した場合には、
25 レチノイン酸の刺激性が緩和されており、その結果炎症を全く惹起していないものであった。

以上の結果から、レチノイン酸- CaCO_3 ナノ粒子は皮膚刺激性が低く、外用製剤として皮膚投与、あるいは化粧品として皮膚への適用をし得るものであることが判明した。

(2) 皮膚投与（塗布）の場合

マウス（ddY 系、5 週齢／雄性）を使用し、マウスの背部を電気バリカンにて剪毛して、上記で得たトリチウム（ ^3H ）ラベルのレチノイン酸およびトリチウム（ ^3H ）ラベルのレチノイン酸のミセルから得たレチノイン酸- CaCO_3 ナノ粒子およびレチノイン酸- ZnCO_3 ナノ粒子を、ワセリン基剤に混合し、皮膚に塗布した。その後時間ごとに血液を採取し、血中のレチノイン酸の量を、シンチレーションカウンターにて測定した。

試験に供した試料は、以下のものである。

- (a) レチノイン酸- CaCO_3 ナノ粒子（平均粒子径：約 20 nm）。
- 10 (b) レチノイン酸- ZnCO_3 ナノ粒子（平均粒子径：約 20 nm）。

また、比較例としてのレチノイン酸は、ナノ粒子化していない、レチノイン酸そのものをワセリン基剤と混合して使用した。

(結果)

第 7 図に、その結果を示した。レチノイン酸- CaCO_3 ナノ粒子（平均粒子径：約 20 nm）およびレチノイン酸- ZnCO_3 ナノ粒子（平均粒子径：約 20 nm）ワセリン基剤に混合して皮膚塗布投与した場合、ナノ粒子化していないレチノイン酸に比較して、レチノイン酸の血中濃度は顕著に高いものであった。

したがって、本発明の多価金属無機塩被覆レチノイン酸ナノ粒子は、その平均粒子径を調整し、特に微細なナノ粒子とすることにより、より効果的にレチノイン酸の薬理効果を発揮し得るものとなることが判明した。

試験例 7：in vivo 実験－皮膚投与における表皮細胞の増殖効果（マウス）

(方法)

マウス（ddy 系、5 週齢／雄性）を使用し、マウスの背部を電気バリカンにて剪毛して、レチノイン酸含有ワセリン基剤製剤（レチノイン酸として 0.1 % 製剤）を、1 日 10 mg / cm^2 量塗布し、連続 4 日間に渡り塗布を行った。5 日目に塗布部の表皮の厚さを測定した。

使用したレチノイン酸としては、以下のものである。

- (a) レチノイン酸- CaCO_3 ナノ粒子（平均粒子径：約 20 nm）。

(b) レチノイン酸- ZnCO_3 ナノ粒子 (平均粒子径: 約 20 nm)。

(c) 塩化カルシウムのみをレチノイン酸ミセルに添加することにより得た、ミセル表面をカルシウムで被覆したレチノイン酸-Ca ナノ粒子 (平均粒子径: 約 20 nm)。

- 5 (d) 塩化亜鉛のみをレチノイン酸ミセルに添加することにより得た、ミセル表面を亜鉛で被覆したレチノイン酸-Zn ナノ粒子 (平均粒子径: 約 20 nm)。
- (e) レチノイン酸単独。

なお、コントロールとして無処理群および基剤としてのワセリンのみ塗布群をおいた。

10 (結果)

その結果を第 8 図に示した。図中の結果からも明らかなように、本発明の有効成分であるレチノイン酸- CaCO_3 ナノ粒子およびレチノイン酸- ZnCO_3 ナノ粒子は、レチノイン酸含有製剤に比較して有意に表皮細胞を増殖させ、表皮の厚みが顕著に増大していることが理解される。

- 15 なお、塩化カルシウムのみをレチノイン酸ミセルに添加することにより得た、ミセル表面をカルシウムで被覆したレチノイン酸-Ca ナノ粒子 [RA-Ca] および塩化亜鉛のみをレチノイン酸ミセルに添加することにより得た、ミセル表面を亜鉛で被覆したレチノイン酸-Zn ナノ粒子 [RA-Zn] も、レチノイン酸単独に比較して表皮の厚みが増大している。このことは、レチノイン酸をミセルとして形成
- 20 させ、金属ハロゲン化物または酢酸化物により安定化させたものにも、レチノイン酸含有製剤に比較して有意に表皮細胞増殖効果が認められることを示すものであり、本発明の一部を構成するものである。

試験例 8 : *in vivo* 実験 HB-EGF mRNA 産生試験 (マウス)

25 (方法)

マウス (ddY 系、5 週齢/雄性) の耳介に、レチノイン酸含有ワセリン基剤製剤 (レチノイン酸として 0.1%) を、1 日 30 mg/耳介塗布し、連続 4 日間に渡り塗布を行った。5 日目に耳を切除し、RNA を抽出し、real-time PCR 法により、HB-EGF mRNA を測定した。

なお、同時に House-keeping gene として GAPDH (リン酸グリセルアルデヒド脱水素酵素: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) mRNA も合成および測定し、相対値として定量した。

使用したレチノイン酸としては、以下のものである。

- 5 (a) レチノイン酸- CaCO_3 ナノ粒子 (平均粒子径: 約 20 nm)。
(b) レチノイン酸- ZnCO_3 ナノ粒子 (平均粒子径: 約 20 nm)。
(c) レチノイン酸単独。

(結果)

- その結果を第 9 図に示した。図中に示した結果からも判明するように、本発明
10 の粒径を調整して得たレチノイン酸- CaCO_3 ナノ粒子 (平均粒子径: 約 20 nm) およびレチノイン酸- ZnCO_3 ナノ粒子 (平均粒子径: 約 20 nm) は、レチノイン酸単独よりも、有意に HB-EGF mRNA を産生していることが理解される。

- HB-EGF mRNA は、上皮細胞の増殖因子であることより、この産生量を
増大させることは本発明の多価金属無機塩被覆レチノイン酸ナノ粒子が皮膚再生
15 能を、顕著に発揮している事実を示すものである。

産業上の利用可能性

- 以上説明したように、本発明により、レチノイン酸のミセル表面を多価金属無機塩の皮膜で被覆してなる粒径が 5 ~ 300 nm に調整された多価金属無機塩被
20 覆レチノイン酸ナノ粒子が提供される。本発明が提供する多価金属無機塩被覆レチノイン酸ナノ粒子は、皮膚透過性が高く、水に溶解した場合には透明溶液の形態を保っているため、皮下および静脈内注射製剤として投与することが可能となる。また、多価金属無機塩の皮膜によりレチノイン酸が被覆されていることから低刺激性であり、投与部位における炎症の発生、腫瘍化などがみられない特性を
25 有している。

したがって、本発明が提供する多価金属無機塩被覆レチノイン酸ナノ粒子は、レチノイン酸の薬理効果を有効に発揮し得るものであって、外用剤あるいは化粧品、さらに再生医療への応用として極めて有効なものであり、その医療上の貢献は多大なものである。

請求の範囲

1. レチノイン酸のミセル表面を多価金属無機塩の皮膜で被覆してなるレチノイン酸ナノ粒子の粒径の調整方法であって、
 - 5 レチノイン酸の低級アルコール溶液をアルカリ水溶液と共に分散し、さらに非イオン性界面活性剤を添加することにより調製した混合ミセルに、2価金属ハロゲン化物または酢酸化物、およびアルカリ金属炭酸化物またはリン酸化物を、モル比で1 : 0 ~ 1. 0 の範囲内で添加することによりミセル表面に多価金属無機塩の皮膜を形成し、その平均粒子径を5 ~ 300 nmの範囲内とすることを特徴とする多価金属無機塩被覆レチノイン酸ナノ粒子の粒径の調整方法。
 - 10 2. ミセル表面に被覆される多価金属無機塩の皮膜が、炭酸カルシウム、炭酸亜鉛またはリン酸カルシウムである請求の範囲第1項に記載する多価金属無機塩被覆レチノイン酸ナノ粒子の粒径の調整方法。
 3. 2価金属ハロゲン化物または酢酸化物が、カルシウムハロゲン化物、亜鉛ハロゲン化物、酢酸カルシウムまたは酢酸亜鉛である請求の範囲第1項に記載する多価金属無機塩被覆レチノイン酸ナノ粒子の粒径の調整方法。
 - 15 4. カルシウムハロゲン化物または亜鉛ハロゲン化物が、塩化カルシウム、臭化カルシウム、フッ化カルシウム、ヨウ化カルシウム、塩化亜鉛、臭化亜鉛、フッ化亜鉛およびヨウ化亜鉛からなる群から選択されるものである請求の範囲第3項に記載する多価金属無機塩被覆レチノイン酸ナノ粒子の粒径の調整方法。
 - 20 5. アルカリ金属炭酸化物またはリン酸化物が、炭酸ナトリウム、炭酸カリウム、リン酸ナトリウムおよびリン酸カリウムからなる群から選択されるものである請求の範囲第1項に記載する多価金属無機塩被覆レチノイン酸ナノ粒子の粒径の調整方法。
 - 25 6. 低級アルコールがメタノールまたはエタノールである請求の範囲第1項に記載する多価金属無機塩被覆レチノイン酸ナノ粒子の粒径の調整方法。
 7. 非イオン性界面活性剤が、ポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノオレート、ポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノラウレート、ポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノステアレート、ポリオキシエチレン(20)ソ

5 ルピタンモノパルミテート、ポリオキシエチレン（20）ソルビタントリオレート、ポリオキシエチレン（8）オクチルフェニルエーテル、ポリオキシエチレン（20）コレステロールエステル、ポリオキシエチレン（30）コレステロールエステルまたはポリオキシエチレン硬化ヒマシ油である請求の範囲第1項に記載する多価金属無機塩被覆レチノイン酸ナノ粒子の粒径の調整方法。

8. レチノイン酸のミセル表面を炭酸カルシウムの皮膜で被覆してなるレチノイン酸ナノ粒子の粒径の調整方法であって、

10 レチノイン酸の低級アルコール溶液をアルカリ水溶液と共に分散し、さらに非イオン性界面活性剤を添加することにより調製した混合ミセルに、塩化カルシウムおよび炭酸ナトリウムを、モル比で1：0～1.0の範囲内で添加することによりミセル表面に炭酸カルシウムの皮膜を形成し、その平均粒子径を5～300nmの範囲内とすることを特徴とする請求の範囲第1項に記載する炭酸カルシウム被覆レチノイン酸ナノ粒子の粒径の調整方法。

15 9. 低級アルコールがメタノールまたはエタノールである請求の範囲第8項に記載する炭酸カルシウム被覆レチノイン酸ナノ粒子の粒径の調整方法。

20 10. 非イオン性界面活性剤が、ポリオキシエチレン（20）ソルビタンモノオレート、ポリオキシエチレン（20）ソルビタンモノラウレート、ポリオキシエチレン（20）ソルビタンモノステアレート、ポリオキシエチレン（20）ソルビタンモノパルミテート、ポリオキシエチレン（20）ソルビタントリオレート、ポリオキシエチレン（8）オクチルフェニルエーテル、ポリオキシエチレン（20）コレステロールエステル、ポリオキシエチレン（30）コレステロールエステルまたはポリオキシエチレン硬化ヒマシ油である請求の範囲第8項に記載する炭酸カルシウム被覆レチノイン酸ナノ粒子の粒径の調整方法。

25 11. 請求の範囲第1ないし7項のいずれかに記載の調整方法により得られた平均粒子径が5～300nmを有する多価金属無機塩被覆レチノイン酸ナノ粒子。

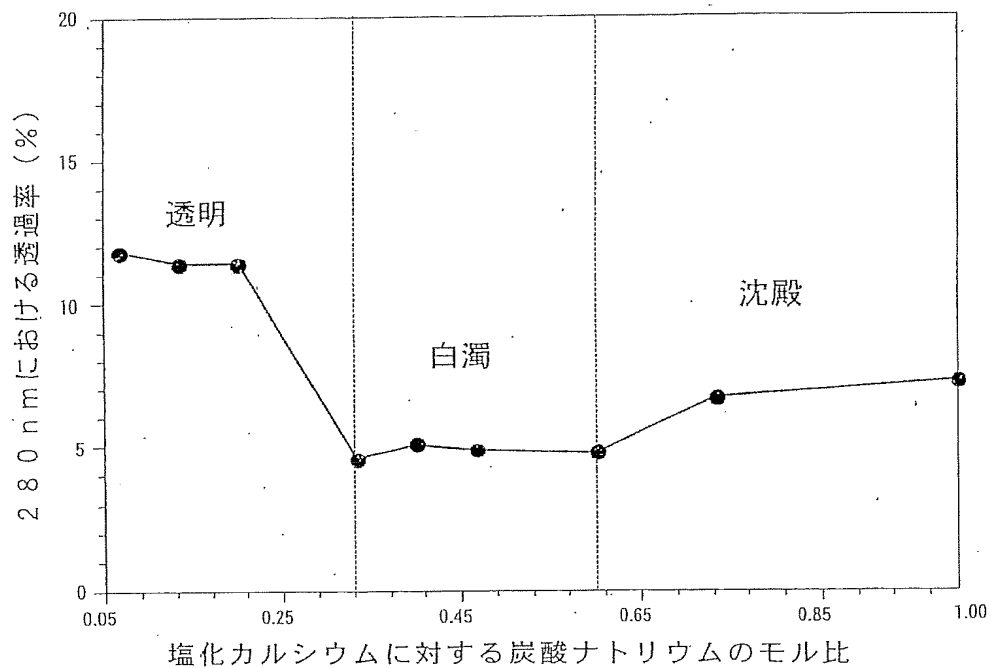
12. 請求項第8ないし10項のいずれかに記載の調整方法により得られた平均粒子径が5～300nmを有する炭酸カルシウム被覆レチノイン酸ナノ粒子。

13. レチノイン酸のミセル表面を炭酸カルシウムの皮膜で被覆してなる平均粒子径が5～300nmを有する炭酸カルシウム被覆ナノ粒子。

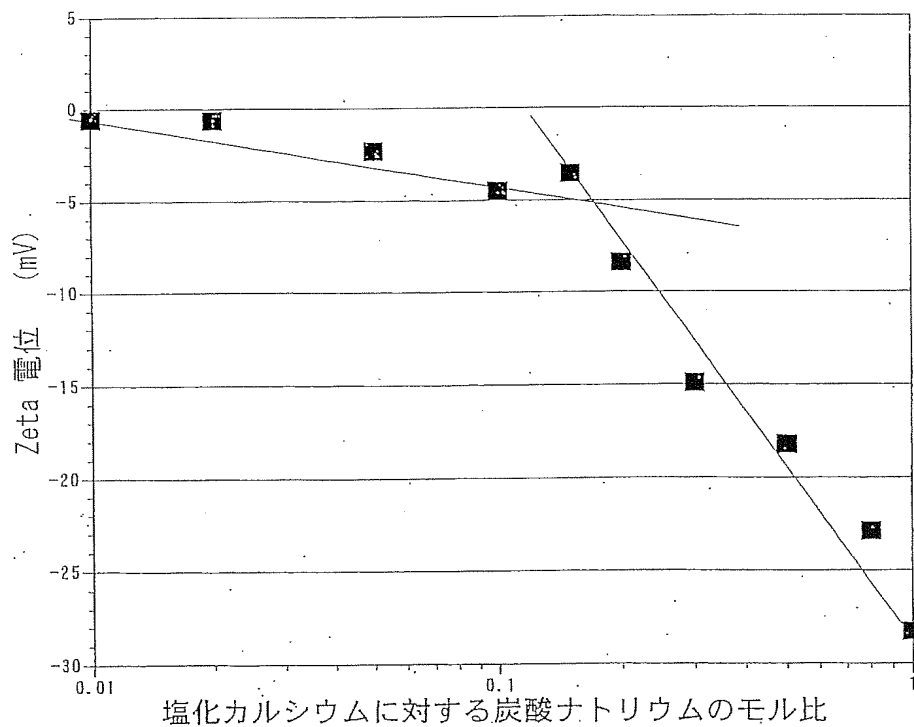
- 1 4. レチノイン酸のミセル表面を炭酸亜鉛の皮膜で被覆してなる平均粒子径が5～300nmを有する炭酸亜鉛被覆レチノイン酸ナノ粒子。
- 1 5. レチノイン酸のミセル表面をリン酸カルシウムの皮膜で被覆してなる平均粒子径が5～300nmを有するリン酸カルシウム被覆レチノイン酸ナノ粒子。

1 / 5

第1図

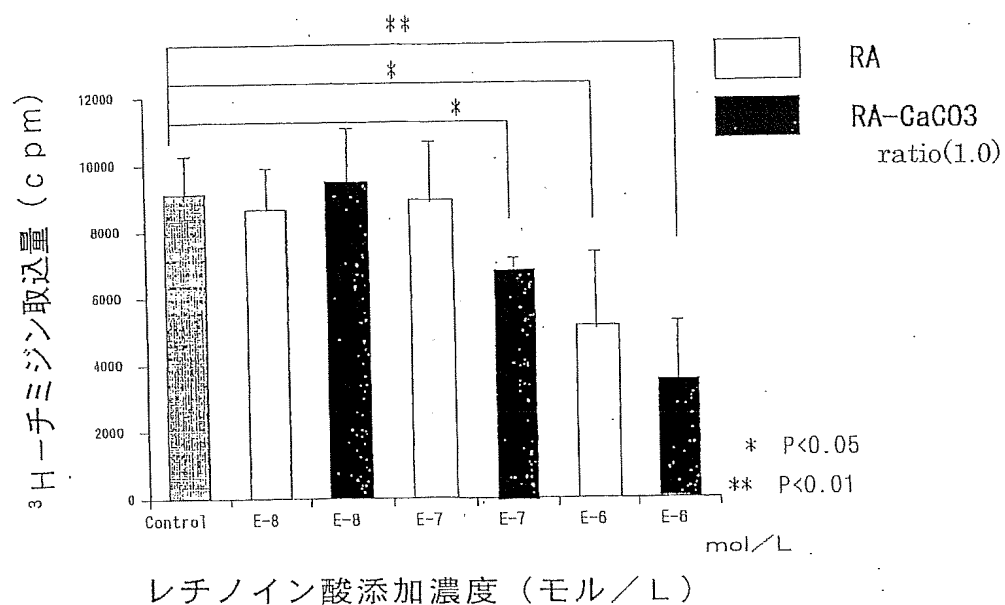


第2図

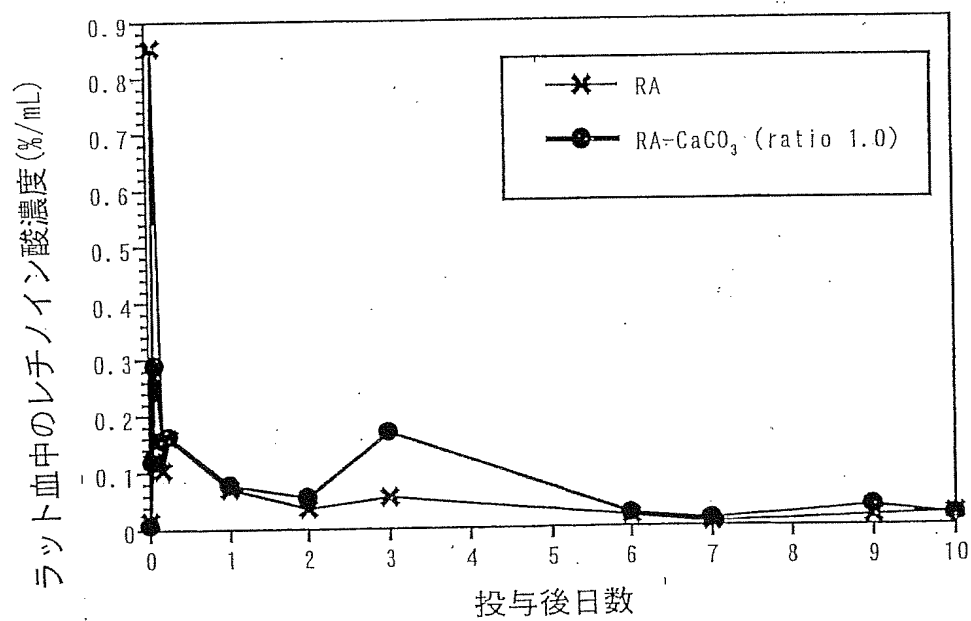


2 / 5

第3図

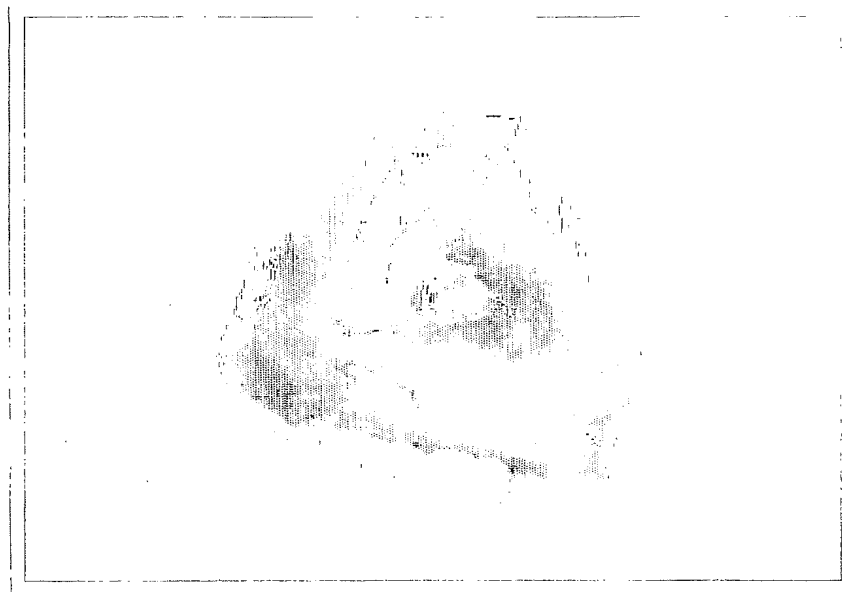


第4図

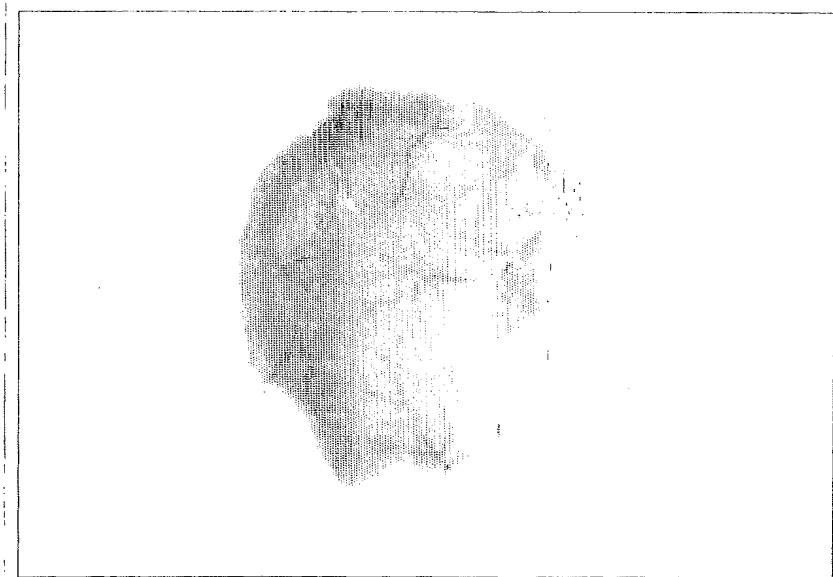


3 / 5

第5図

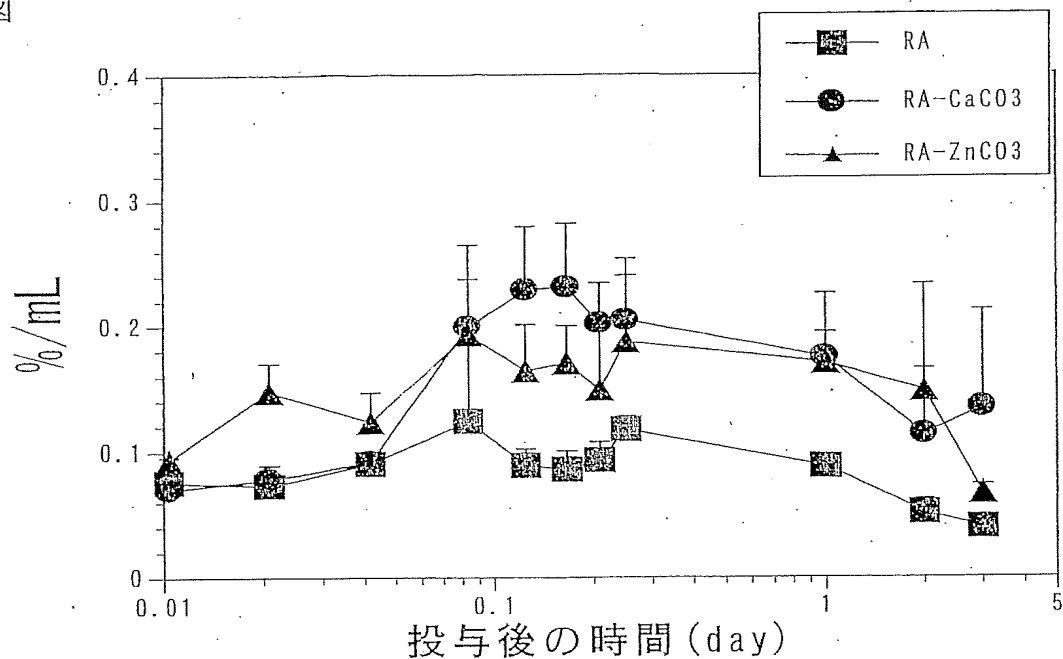


第6図

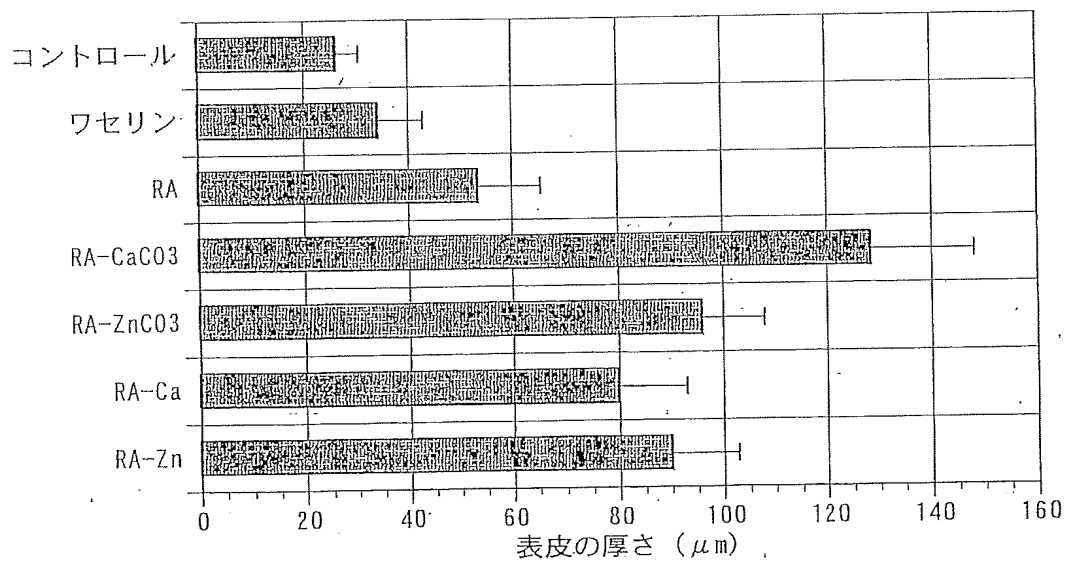


4 / 5

第7図

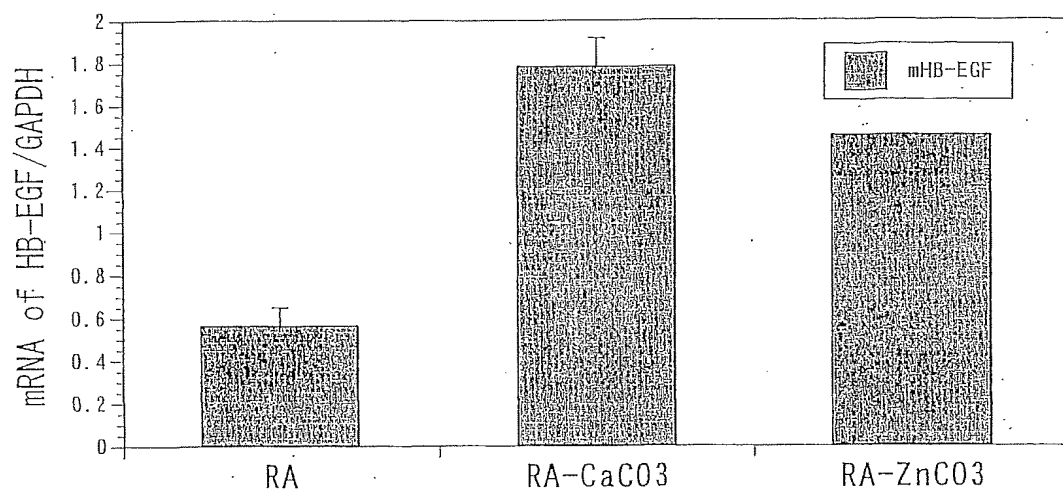


第8図



5 / 5

第9図



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/13180

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.⁷ A61K31/203, 9/51, 47/02, 47/10, 47/30, A61P3/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.⁷ A61K31/203, 9/51, 47/02, 47/10, 47/30, A61P3/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CAPLUS (STN), REGISTRY (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	Yoko YAMAGUCHI, Rie IGARASHI, 'Retinoic Acid Koshitsu Nano Particle no Hifu Saisei eno Kokoromi', Drug Delivery System (DDS), 2003, Vol.18, No.3, May, page 221	11 1-10, 12-15
Y	WO 93/15720 A1 (VESTAR INC.), 19 August, 1993 (19.08.93), In particular, page 3, line 6 to page 4, line 19 & JP 6-506460 A In particular, page 3, upper right column, line 8 to lower left column, line 19	1-10, 12-15
Y	WO 01/052817 A2 (BIODELIVERY SCIENCE INC.), 26 July, 2001 (26.07.01), Full text & JP 2003-529557 A Full text	1-10, 12-15

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
 "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "E" earlier document but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
04 December, 2003 (04.12.03)

Date of mailing of the international search report
24 December, 2003 (24.12.03)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A61K31/203, 9/51, 47/02, 47/10, 47/30, A61P3/02

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A61K31/203, 9/51, 47/02, 47/10, 47/30, A61P3/02

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
CAPLUS (STN), REGISTRY (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	山口葉子、五十嵐理慧, 「レチノイン酸硬質ナノパーティクルの皮膚再生への試み」, Drug Delivery System (DDS), 2003, Vol. 18, No. 3 May, p221	11 1-10, 12-15
Y	WO 93/15720 A1 (VESTAR INC.) 1993. 08. 19, 特に第3頁第6行-第4頁第19行 & JP 6-506460 A 特に第3頁右上欄第8行-左下欄第19行	1-10, 12-15
Y	WO 01/052817 A2 (BIODELIVERY SCIENCE INC.) 2001. 07. 26 全文 & JP 2003-529557 A 全文	1-10, 12-15

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

24.12.03

国際調査を完了した日

04. 12. 03

国際調査報告の発送日

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

安藤 倫世

4P

3230

電話番号 03-3581-1101 内線 3492